

安神补脑液对睡眠剥夺大鼠脑内诱导型一氧化氮合酶及褪黑素的影响

魏海峰, 叶翠飞, 吴燕川, 王玉兰, 丁月霞, 赵 宁, 李 林 (首都医科大学宣武医院, 教育部神经变性病重点实验室, 北京 100053)

摘要: 目的 研究安神补脑液对睡眠剥夺大鼠脑内诱导型一氧化氮合酶(iNOS)及褪黑素的影响。方法 SD大鼠随机分成正常对照组, 模型组, 安神补脑液高、低剂量组。灌胃给予安神补脑液2周后, 用多站台水环境法复制睡眠剥夺模型, 取前脑组织测定iNOS的活性, 并用高效液相色谱法测定脑内褪黑素的含量。结果 与正常对照组比较, 睡眠剥夺大鼠脑组织iNOS活力显著增高, 褪黑素有减少的趋势。大剂量安神补脑液可使模型大鼠iNOS活力明显降低($P < 0.05$), 褪黑素含量显著提高($P < 0.05$)。结论 安神补脑液可拮抗睡眠剥夺大鼠脑内iNOS活力提高, 并能增高松果体褪黑素的含量, 提示安神补脑液可以改善睡眠障碍导致的脑功能改变。

关键词: 安神补脑液; 睡眠剥夺; 诱导型一氧化氮合酶; 褪黑素; 大鼠

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1003-9783(2007)05-0369-03

Effects of Anshen Bunao Syrup on the Inducible Nitric-oxide Synthase Activity and Melatonin Content in Brain of Sleep Deprivation Rats

WEI Haifeng, YE Cuifei, WU Yanchuan, WANG Yulan, DING Yuexia, ZHAO Ning, LI Lin (Dept. of Pharmacology, Xuanwu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Education Ministry Key Laboratory for Neuro-degenerative Diseases, Beijing 100053)

Abstract: **Objective** To study the effects of Anshen Bunao Syrup (ABS) on the inducible nitric-oxide synthase (iNOS) activity and melatonin content in brain of sleep deprivation (SD) rats. **Methods** Rats were divided into groups of normal control, SD model, SD + low-dose ABS, and SD + high-dose ABS. The rats were fed with ABS for 2 weeks and were subjected to sleep deprivation for 4 days, and then the iNOS activity in the front cortex was analyzed, and melatonin content in the pineal gland was analyzed with HPLC. **Results** Compared with the normal control rats, the iNOS activity was significantly increased in the front cortex of SD rats and the melatonin content decreased in. Large-dose ABS significantly decreased iNOS activity and increased melatonin content in SD model rats. **Conclusion** Anshen Bunao Syrup can effectively counteract iNOS activity increase and melatonin secretion disturbance in the brain of SD rats, and can improve the cerebral function of rats with sleep disorder.

Keywords: Anshen Bunao Syrup; Sleep deprivation; iNOS; melatonin; Rats

睡眠是人体重要的生理功能, 对人体各系统功能调整有重要的作用。许多研究表明睡眠剥夺可以导致免疫功能减低、认知功能下降、反应迟钝等现象^[1]。安神补脑液是由吉林敖东延边药业股份有限公司开发的中药复方制剂, 含何首乌、淫羊藿、鹿茸等中药, 临床研究证实该药对睡眠障碍引起的神经衰弱有良好治疗作用^[2], 但是其治疗机制尚不清楚。作者的前期研究已经发现安神补脑液可以有效改善睡眠剥夺引起的大鼠学习记忆能力减低^[3], 本研究进一步探讨该药

对大鼠前脑组织诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)活力以及松果体内褪黑素含量的影响。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与动物 安神补脑液, 由吉林敖东延边药业股份有限公司提供, 为35倍浓缩液, 用之前用蒸馏水稀释。一氧化氮合成酶(NOS)试剂盒购自南京建成生化技术公司。Folin 酚购自北京鼎国生物技术公司。褪黑素(Melatonin, MT)购自Sigma公

收稿日期: 2007-03-27

作者简介: 魏海峰(1971-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 神经药理学。Email: hf712000@yahoo.com.cn。通讯作者, 李林, 研究员, 博士生导师。Email: linli97@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金(90709011, 30340090); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(G2003CB517104); 北京市自然科学基金(7032013)。

司,乙腈购自 Invitrogen 公司。SD 大鼠,雄性,体重(250 ± 30)g,购于北京维通利华实验动物中心,合格证号:SCXK(京)2002-003,在 SPF 级动物房适应性饲养 1 周。

1.2 仪器与设备 高效液相色谱仪(HPLC, Hewlett Packard1050 型),包括 HP1050 泵、HP1049A 电化学检测器、HP1050 手动进样器、HP 化学工作站;紫外可见分光光度计,8453 型,美国惠普公司。

1.3 动物分组 大鼠随机分为正常对照组,睡眠剥夺模型组,补脑液低、高剂量组,每组 15 只。按人与大鼠等效剂量换算法,补脑液低剂量(人用药原液 2 mL/kg)相当于成人每日用量,大剂量(人用药原液 6 mL/kg)相当于成人每日用量的 3 倍,正常对照和模型组给等量的蒸馏水,灌胃给药,每天 1 次。给药 2 周后进行实验造模,造模期间继续给药。

1.4 造模与取材方法 睡眠剥夺箱参考巴西 Machado 等^[4]的多站台水环境法,委托中国医学科学院药物研究所加工制成。水箱规格:127 cm × 44 cm × 44 cm,其内放置 13 个站台,站台高 20 cm,上面直径 7 cm。实验造模时以水面离站台 1 cm,将大鼠放入睡眠箱,每箱放入 10 只。正常对照组放在同一实验室内的笼内。各组动物自由进食和水,前后经历 4 d。睡眠剥夺后于上午 9 时~11 时,将大鼠以 10% 水合氯醛 0.4 mg/kg 腹腔注射麻醉后处死,剥离脑组织并分离出前脑和松果体分别放在液氮罐中,置 -80 °C 冰箱内保存直至样品处理。

1.5 iNOS 活力测定 取前脑组织以生理盐水匀浆,3000 r/min 离心 10 min,吸取上清,以 Lowry 法进行蛋白定量^[5],其余步骤按 NOS 试剂盒要求严格操作。

1.6 褪黑素含量测定 参考 Vieira 等^[6]的方法略加改进。HPLC 色谱条件:Waters C₁₈ 反相柱,250 × 4.6 mm,5 μm,灵敏度为 1 nA。流动相:乙酸钠 50 mmol/L,乙酸 10050 mmol/L,Na₂-EDTA 0.150 mmol/L,30% 乙腈,柱温为室温,流速为 1 mL/min,电压 0.9 V,进样量为 50 μL。样品处理:取出冰冻的松果体,置聚丙烯离心管中,加 90 μL 0.1 mol/L 高氯酸溶液,在超声处理机下粉碎 5 s,间隔 20 s,重复 3 次。置低温离心机 4 °C 条件下 12000 g 高速离心 10 min,取上清液备用。褪黑素标准品以双蒸水进行浓度梯度稀释成 100 μg/mL 储存液,-80 °C 冰箱保存;将储存液稀释成 0.78,1.56,3.125,6.25,12.5 μg/mL 浓度测定,并制备标准曲线,其回归方程式为 $Y = 1.349 X + 5.400$, $r = 0.9994$ 。计算每个松果体中褪黑素的平均含量(pg)。

因为该方法要求电势较高,第一批样品每组 5 只检测过程中参比电极损坏,所以在电极更新后将第二、三批样品检测结果用于统计,模型及给药组每组 10 只,正常对照组 8 只(取样时不慎丢失 2 只)。

1.7 数据处理 数据以“均数 ± 标准差”(x̄ ± s)表示,用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间比较。

2 结果

2.1 安神补脑液对睡眠剥夺大鼠前脑 iNOS 活力的影响 睡眠剥夺大鼠前脑组织的 iNOS 活力比正常对照组显著增高($P < 0.05$),补脑液高剂量组大鼠 iNOS 的活力明显下降($P < 0.05$),见表 1。提示安神补脑液可有效抑制大鼠睡眠剥夺后出现的 iNOS 活力增高。

表 1 安神补脑液对睡眠剥夺大鼠前脑组织 iNOS 活力的影响(x̄ ± s, n = 15)

分 组	剂量/mL · kg ⁻¹	iNOS 活力/U · mg ⁻¹
正常对照组		11.06 ± 3.48*
模型组		14.40 ± 3.34
补脑液低剂量组	2	12.94 ± 2.16
补脑液高剂量组	6	11.59 ± 3.14*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 安神补脑液对睡眠剥夺大鼠松果体内褪黑素含量的影响 与正常对照组比较,睡眠剥夺大鼠松果体内褪黑素含量有减少的趋势,但无显著性意义($P > 0.05$);安神补脑液可使该模型松果体内褪黑素含量增加,大剂量组有显著性差异($P < 0.05$),见图 1。表明安神补脑液能提高睡眠剥夺大鼠松果体内褪黑素含量。

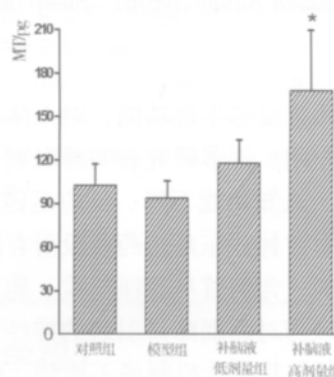


图 1 安神补脑液对睡眠剥夺大鼠松果体褪黑素含量的影响(x̄ ± s)与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

睡眠是人及动物的重要生理功能,长期睡眠障

碍可导致学习记忆能力减退、免疫功能减低、神经细胞毒性增高、神经递质产生异常等脑功能紊乱改变^[7]。安神补脑液在临床用来治疗睡眠障碍引起的失眠和神经衰弱，取得良好疗效。该药处方中的淫羊藿水提液和鹿茸能抑制小鼠自发活动，缩短阈上剂量戊巴比妥钠的入睡时间和延长戊巴比妥钠的睡眠时间，表现出镇静催眠作用^[8-9]。本研究发现安神补脑液可以有效抑制大鼠睡眠剥夺引起的脑组织 iNOS 活力增高，并升高睡眠剥夺大鼠松果体中褪黑素含量，提示该药对睡眠障碍引起的脑功能紊乱也有一定的改善作用。

睡眠障碍导致脑功能减低的机制尚不清楚，研究表明一氧化氮神经毒性作用可能与其有关。睡眠剥夺可以使大鼠脑额区和海马 iNOS 显著升高^[10]。iNOS 抑制剂对水站睡眠剥夺应激鼠有良好的抗焦虑作用^[11]，提示一氧化氮产生过多可能与睡眠剥夺导致的焦虑行为有关。在小鼠脑内 iNOS 的活力以及表达量增高可能引起睡眠时期间断缺氧导致的行为障碍^[12]。在老年鼠海马和皮质神经的 iNOS 表达量增高，并且与其学习记忆能力损害相关^[13]，提示 iNOS 表达量异常增高对海马可能有神经毒性。安神补脑液的主要药味淫羊藿可有效抑制 D-半乳糖诱导的衰老小鼠大脑皮层一氧化氮活力增高^[14]，何首乌可抑制脑缺血再灌注损伤后脑一氧化氮含量的升高^[15]，这些作用可能是安神补脑液降低睡眠剥夺引起的前脑组织 iNOS 活力增高的原因。

松果体分泌的褪黑素与睡眠有密切的关系。在人体睡眠剥夺后可以引起褪黑素的分泌节律紊乱^[16]，大鼠长期睡眠剥夺后可导致褪黑素含量减低^[17]，松果体细胞出现内质网、线粒体和高尔基体扩张、细胞膜结构破坏等退行性改变，而褪黑素补充可以减轻这些改变^[18]。同时，褪黑素对人和动物维持正常的脑功能有重要的作用，褪黑素的分泌水平下降与神经退行性疾病有密切的关系^[19]，补充褪黑素可以改善动物脑损伤模型的学习记忆能力^[20]。这些研究结果提示，安神补脑液对睡眠剥夺大鼠松果体内褪黑素水平的升高作用，可能与改善睡眠剥夺后的脑功能减退有关。

参考文献：

[1] Yamanaka K, Mishory A, Koola J, et al. Decreased cortical response to verbal working memory following sleep deprivation[J]. Sleep, 2005, 28(1): 55-67.
 [2] 马岳青. 安神补脑液治疗神经衰弱 184 例[J]. 吉林中医药, 1998, 18(4): 62.

[3] 魏海峰, 叶翠飞, 丁月霞, 等. 安神补脑液对睡眠剥夺大鼠的学习记忆能力以及海马内神经生长因子表达的影响[J]. 中国临床药理与治疗学杂志, 2006, 11(11): 1230-33.
 [4] Machado RB, Hipolide DC, Benedito-Silva AA, et al. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery[J]. Brain Res, 2004, 1004(1-2): 45-51.
 [5] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265-275.
 [6] Vieira R, Miguez J, Lema M, et al. Pineal and plasma melatonin as determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. Anal Biochem, 1992, 205(2): 300-305.
 [7] Taber KH, Hurley RA. Functional neuroanatomy of sleep and sleep deprivation[J]. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2006, 18(1): 1-5.
 [8] 严金玲, 钟有添, 曾靖, 等. 淫羊藿水提取液对小鼠睡眠功能和自发活动的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(33): 7460-7461.
 [9] 王岩, 金淑莉, 陈晓光. 鹿茸胶囊抗惊厥和镇静作用的实验研究[J]. 长春中医药大学学报, 2003, 19(2): 31-32.
 [10] 吴兴曲, 杨来启, 王晓峰. 睡眠剥夺对大鼠一氧化氮和一氧化氮合酶的影响[J]. 中国临床心理学杂志 2002, 10(2): 106.
 [11] Pokk P, Vali M. The effects of the nitric oxide synthase inhibitors on the behaviour of small-platform-stressed mice in the plus-maze test [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2002, 26(2): 241-247.
 [12] Li RC, Row BW, Kheirandish L, et al. Nitric oxide synthase and intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits in the rat[J]. Neurobiol Dis, 2004, 17(1): 44-53.
 [13] Law A, O'Donnell J, Gauthier S, et al. Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired Long-Evans rats[J]. Neuroscience, 2002, 112(2): 267-275.
 [14] 包名家, 周维民, 王建萍. 淫羊藿对 D-半乳糖诱导的衰老小鼠大脑皮层一氧化氮的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2005, 25(1): 460-461.
 [15] 张媛英, 翟静, 孙凌云, 等. 何首乌提取物对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国临床康复, 2005, 9(33): 86-87.
 [16] Cajochen C, Jewett ME, Dijk DJ. Human circadian melatonin rhythm phase delay during a fixed sleep-wake schedule interspersed with nights of sleep deprivation[J]. J Pineal Res, 2003, 35(3): 149-157.
 [17] 余晓俊, 韦京豫, 李慧琴, 等. 睡眠剥夺大鼠松果体中褪黑素含量测定[J]. 解放军预防医学杂志, 2002, 20(5): 343-345.
 [18] Lan CT, Hsu JC, Ling EA. Influence of sleep deprivation coupled with administration of melatonin on the ultrastructure of rat pineal gland[J]. Brain Res, 2001, 910(1-2): 1-11.
 [19] Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Maestroni GJ, et al. Role of melatonin in neurodegenerative diseases[J]. Neurotox Res, 2005, 7(4): 293-318.
 [20] Feng Z, Qin C, Chang Y, et al. Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40(1): 101-109.

(编辑：梁进权)